

## Process for preparing pantothenic acid by amplifying nucleotide sequence of coded ketopantothate reductase

**Publication number:** CN1254758

**Publication date:** 2000-05-31

**Inventor:** AILISCHVIESCKIE F (DE); KLINORFFSKY J (DE);  
PLOE A (DE)

**Applicant:** DEGUSSA HURERSI AG (DE)

**Classification:**






- **International:** C12N15/09; C12N1/21; C12N9/00; C12N9/02;  
C12N9/04; C12N9/88; C12N15/53; C12P7/42;  
C12P13/02; C12R1/15; C12R1/19; C12R1/645;  
C12N15/09; C12N1/21; C12N9/00; C12N9/02;  
C12N9/04; C12N9/88; C12N15/53; C12P7/40;  
C12P13/00; (IPC1-7): C12N15/52; C07C235/12;  
C12N1/21; C12N9/00; C12N15/67; C12N15/70;  
C12P7/42; C12P13/02

- **European:** C12N9/02B; C12P7/42

**Application number:** CN19991023999 19990929

**Priority number(s):** DE19981046499 19981009

**Also published as:**

 EP1001027 (A2)  
 US6171845 (B1)  
 ZA9906367 (A)  
 JP2000116387 (A)  
 EP1001027 (A3)

more >>

**Report a data error here**

Abstract not available for CN1254758

Abstract of corresponding document: **DE19846499**

Production, and improvement, of pantothenic acid (I)-producing microorganisms by amplifying (particularly overexpressing) sequences (I) that encode ketopanthoate reductase (KPR), specifically the panE gene, either individually or together. Optionally the ilvC gene is also amplified. Independent claims are also included for the following: (1) plasmid vectors pFE80, pFE65 and pFE32, deposited, in Escherichia coli K12 strain MG1655, as DSM 12414, 12382 and 12413, respectively; (2) the E. coli K12 strain FE6 which is resistant to valine; (3) the E. coli strain FE7 in which the avtA gene is exchanged for a avtA::aadB fragment (deposited as DSM 12380); (4) a host microorganism (E. coli or Corynebacterium) that contains one of the specified plasmids and is optionally resistant to one or more metabolites and/or antimetabolites; C. glutamicum ATCC13032/pFE91, where pFE91 includes the C. glutamicum ilvC gene; and (5) production of (I) by culturing any of the specified microorganisms and isolation of (I) from medium or cells.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99123999.7

C12N 15/52

C12N 15/67 C12N 9/00

C12N 15/70 C12N 1/21

C12P 13/02 C12P 7/42

C07C235/12

[43]公开日 2000 年 5 月 31 日

[11]公开号 CN 1254758A

[22]申请日 1999.9.29 [21]申请号 99123999.7

[30]优先权

[32]1998.10.9 [33]DE [31]19846499.1

[71]申请人 底古萨-胡尔斯股份公司

地址 联邦德国法兰克福

[72]发明人 F·艾利施维斯基 J·卡林诺夫斯基

A·普勒 N·杜施 J·多曼

M·法维克 G·西尔巴赫

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事  
务所

代理人 郭建新

权利要求书 2 页 说明书 32 页 附图页数 9 页

[54]发明名称 通过扩增编码酮泛解酸盐还原酶的核苷酸  
序列制备泛酸的方法

[57]摘要

本发明涉及通过扩增编码酮泛解酸盐还原酶的核苷酸序列,特别是 panE 基因,单独地或彼此结合地,和任选地还扩增 ilvC 基因,制备和改善产生泛酸的微生物的方法,该微生物含有这些核苷酸序列,和用于制备 D-泛酸的方法,包括 发酵这些微生物,浓缩培养基或微生物细胞中的泛酸,和分离 D-泛酸。

ISSN 1000-8427 4

## 权 利 要 求 书

1. 通过扩增，特别是过量表达编码酮泛解酸盐还原酶的核苷酸序列，特别是 *panE* 基因，单独地或彼此结合地，和任选地还扩增，特别是过量表达 *ilvC* 基因，制备和改善产生泛酸的微生物的方法。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于为了获得过量的表达，通过插入携带这些基因或核苷酸序列的质粒载体来增加微生物中基因或核苷酸序列的拷贝数。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于为了获得过量的表达，将结构基因上游的启动子和调节区域进行突变。

4. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于为了获得过量的表达，将表达盒掺入到结构基因的上游。

5. 根据权利要求 1-4 所述的方法，其特征在于在具有一个或多个代谢物和/或抗代谢物抗性突变的微生物中扩增，特别是过量表达编码酮泛解酸盐还原酶的核苷酸序列。

6. 根据权利要求 2-5 所述的方法，其特征在于为了获得扩增或过量表达，改变培养基和/或发酵程序。

7. 根据权利要求 1-6 所述的方法，其特征在于在微生物中去除降低了泛酸盐(泛酸)的形成的代谢途径。

8. 根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于去除了 *avtA* 基因。

9. 根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于去除了 *ilvE* 基因。

10. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于在微生物中，特别是在棒状杆菌属或大肠杆菌中过量表达或扩增谷氨酸棒状杆菌的 *ilvC* 基因。

11. 根据权利要求 1-9 所述的方法，其特征在于除了编码酮泛解酸盐还原酶的核苷酸序列之外，扩增，特别是过量表达了一个或多个泛酸形成的代谢途径的基因。

12. 根据权利要求 11 所述的方法，其特征在于还扩增、尤其是过量表达一个或多个编码酮泛解酸盐羧基甲基转移酶(EC 4. 1. 2. 12)，天冬氨酸 1-脱羧基酶(EC 4. 1. 1. 11)和泛酸盐合成酶(EC 6. 3. 2. 1)的基因。

13. 根据权利要求 11 和 12 所述的方法，其特征在于使用了含有所述基因的

各种相容质粒载体。

14. 根据权利要求 10 和 11 所述的方法，其特征在于使用了用彼此相容的一个或多个质粒载体转化的菌株，该质粒载体携带一个或多个所述基因，包括 *panE* 基因，可以将所述基因置于公用的启动子的控制下，连续地排列，或在各种启动子的控制下彼此独立地排列。

15. 质粒载体 pFE80，其特征在于附图 6 再现的限制性图谱寄存于大肠杆菌 K12MG1655/pFE80，保藏号为 DSM 12414。

16. 质粒载体 pFE65，其特征在于附图 5 再现的限制性图谱寄存于大肠杆菌 K12MG1655/pFE65，保藏号为 DSM 12382。

17. 质粒载体 pFE32，其特征在于附图 4 再现的限制性图谱寄存于大肠杆菌 K12MG1655/pFE32，保藏号为 DSM 12413。

18. 大肠杆菌 K12 菌株 FE6，它携带缬氨酸抗性。

19. 大肠杆菌 K12 菌株 FE7，其中以 *avtA::aadB* 片段交换 *avtA* 基因，该菌株保藏号为 DSM 12380。

20. 大肠杆菌或棒状杆菌属的微生物(宿主细胞)，它含有权利要求 11 - 14 所述的质粒载体之一并且任选地含有一个或多个代谢物和/或抗代谢物抗性。

21. 谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032/pFE91，它含有具有谷氨酸棒状杆菌的 *ilvC* 基因的质粒载体 pFE91。

22. 制备泛酸的方法，其特征在于实施了下面的步骤：

- a) 将前面一项或多项权利要求所述的微生物发酵，
- b) 将培养基或微生物细胞中的泛酸浓缩，
- c) 分离泛酸。

23. 根据权利要求 22 所述的方法，其特征在于加入酮泛解酸盐作为前体。

24. 根据权利要求 23 所述的方法，其特征在于在步骤 a) 中加入选自  $\beta$ -丙氨酸或酮异戊酸的泛酸的前体。

25. 根据前面一项或多项权利要求所述的方法，其特征在于使用了大肠杆菌或棒状杆菌或酵母属的微生物。

通过扩增编码酮泛解酸盐还原酶  
的核苷酸序列制备泛酸的方法

泛酸是具有重要的商业价值的维生素，该维生素可用于化妆品，医药，人类的营养品和动物的营养品。

采用化学合成方法，或者采用通过将合适的微生物在合适的营养液中发酵的生物技术方法可以制备泛酸。对于化学合成方法，DL-pantolactone 是一种重要的化合物。它是采用多步方法从甲醛，异丁醛和氰化物制备的。在该方法的其它步骤中，分离外消旋混合物，将 D-pantolactone 与  $\beta$ -丙氨酸进行缩合反应，而获得了 D-泛酸。

采用微生物发酵制备的优点在于直接形成需要的 D-型立体异构体。

各种类型的细菌，例如大肠杆菌，产脲节杆菌，产红棒杆菌，产氨棒杆菌，还有酵母例如 *Debaromyces castellii* 可以在营养液中产生 D-泛酸。所述的营养液含有葡萄糖，DL-泛解酸和  $\beta$ -丙氨酸，如 EPA0493060 所述。EPA0493060 进一步证明了对于大肠杆菌，通过在含有葡萄糖，DL-泛解酸和  $\beta$ -丙氨酸的营养液中扩增泛酸生物合成基因改善了 D-泛酸的生成。所述基因包含于质粒 pFV3 和 pFV5 中。

EPA0590857 和美国专利 US5518906 描述了来自于大肠杆菌菌株 IF03547 的突变体，如 FV5714, FV525, FV814, FV521, FV221, FV6051 和 FV5069，它们携带了抗各种抗代谢物抗性例如水杨酸， $\alpha$ -氧代丁酸， $\beta$ -羟基天冬氨酸，O-甲基苏氨酸和  $\alpha$ -酮异戊酸并且在包括葡萄糖的营养液中产生泛解酸和在包括葡萄糖和  $\beta$ -丙氨酸的营养液中产生 D-泛酸。EPA0590857 和美国专利 US5518906 进一步证明，在上面提到的菌株中扩增包含于质粒 pFV31 中的泛酸生物合成基因之后，在包括葡萄糖的营养液中 D-泛解酸的产生和在包括葡萄糖和  $\beta$ -丙氨酸的营养液中 D-泛酸的产生得到改善。

此外 W097/10340 证明在形成泛酸的大肠杆菌菌株中，通过增加乙酰羟酸合酶 II (一种缬氨酸生物合成酶) 的活性进一步提高了泛酸的产生。

本发明人的目的是提供用于制备泛酸的改善方法的新原理。

维生素泛酸是一种重要的商品，可用于化妆品，医药，人类的营养品和动物的营养品。因此，在提供改善的制备泛酸的方法方面有普遍的需求。当在下文中提到 D-泛酸或泛酸或泛酸盐时，不仅是指游离的酸而且是指 D-泛酸盐，例如钙盐、钠盐、铵盐或钾盐。

本发明提供了通过扩增，特别是过量表达编码酮泛解酸盐还原酶的核苷酸序列，特别是 panE 基因，单独地或彼此结合地，和任选地还扩增，特别是过量表达 ilvC 基因，制备和改善产生泛酸的微生物的方法。

在本文中术语“扩增”描述了通过利用强效的启动子或编码相应的具有高比活性的酶的基因，和非强制性地将这些措施结合起来增加基因的拷贝数，从而增加了由相应的 DNA 编码的一个或多个酶的胞内活性。

特别是，已经发现通过将 panE 基因与基因 panB，panC 和 panD 一起过量表达，进一步改善了泛酸的形成。为了获得过量表达，借助于质粒载体例如 pBR322(Sutcliffe, 关于定量生物学的冷泉港年会 1979, 43: 77 - 90) 或 pUC19(Viera, 基因 1982 19: 259 - 268) 可以增加相应的基因的拷贝数，或可以将结构基因上游的启动子和调节区域突变。这样的已知的例子是 lac 启动子的 lac-UV5 突变(Winnacker: 从基因到克隆，有关基因技术的介绍(化学出版社, Weinheim, 德国, 1990))。掺入到结构基因上游的表达盒以同样的方式起作用。例如由 LaVallie 等人(生物/技术 11, 187 - 193(1993)和 PCT/US97/13359)已经使用了该方法。或者，通过改变培养基的组成和培养程序可以实现所需基因的过量表达。这样的例子是公知的由葡萄糖和乳糖对 lac 操纵子的表达的调节。此外本发明人已经发现在对代谢物和抗代谢物有抗性突变的菌株中 panE 基因的过量表达具有有利的作用，例如对 L-缬氨酸有抗性。此外已经发现在代谢途径的基因例如 avtA 或 ilvE 基因有缺陷突变的菌株中 panE 基因的过量表达具有有利的作用，所述的基因转化泛酸前体或降低泛酸的形成。

本发明涉及的微生物可以从葡萄糖，蔗糖，乳糖，果糖，麦芽糖，糖蜜，淀粉，纤维素或从甘油和乙醇制备泛酸。这些微生物是真菌，酵母或特别是革兰氏阳性细菌例如棒杆菌属的，或革兰氏阴性细菌例如肠杆菌科的微生物。在上面提到的肠杆菌科中，可特别提及具有大肠杆菌的埃希氏菌属。在大肠杆菌种内，可以提到的是所谓的 K-12 菌株，例如菌株 MG1655 或 W3110(Neidhard 等人：大肠杆菌和沙门氏菌属。细胞和分子生物学(ASM 出版，华盛顿 D.C.))或大肠杆

菌野生型菌株 IF03547(日本, Osaka 发酵研究院)和来自于这些菌株的突变体。对于棒杆菌属, 特别可以提到的是谷氨酸棒杆菌, 这是专家们已知的可用于形成氨基酸的菌株。该种包括野生型菌株, 例如谷氨酸棒杆菌 ATCC13032, 黄色短杆菌 ATCC14067, 栖废糖蜜棒杆菌(*Corynebacterium melassecola*)ATCC17965 和其它。

为了分离 *ilvC* 基因和 *panE* 基因, 首先制备了例如在 *ilvC* 基因和 *panE* 基因中携带突变的大肠杆菌的突变体。

大肠杆菌的 *ilvC* 基因的核苷酸序列是已知的(Wek 和 Hatfield, 生物化学杂志 261, 2441 - 2450(1986))。分离染色体 DNA 的方法也是已知的(Sambrook 等人, 分子克隆, 实验室手册(冷泉港实验室出版, 1989))。通过选择合适的引物, 可借助于聚合酶链反应扩增 *ilvC* 基因(Innis 等人, PCR 方案, 方法和应用导论, 1990, 学术出版社)。然后将其导入到质粒载体。可能的质粒载体是那些能够在相应的微生物中复制的载体。对于大肠杆菌例如载体 pSC101(Vocke 和 Bastia, 美国国家科学院院报 80(21), 6557 - 6561(1983))或 pKK223 - 3(Brosius 和 Holy, 美国国家科学院院报 81, 6929(1984)), 对于谷氨酸棒杆菌例如载体 pJC1(Cremer 等人, Mol. Gen. Genet. 220:478-480(1990))或 pEKE × 2(Eikmanns 等人, 基因 102: 93 - 98(1991))或 pZ8-1(欧洲专利说明书 0375889)和对于啤酒酵母例如载体 pBB116(Berse, 基因 25: 109 - 117(1983))或 pDG1(Buxton 等人, 基因 37: 207 - 214(1985))可用于本发明。将 DNA 片段掺入到质粒载体的方法由 Sambrook 等人, 分子克隆, 实验室手册(冷泉港实验室出版, 1989)描述。用于转化和电穿孔的方法由 Tauch 等人描述(FEMS 微生物学通讯 123: 343 - 347(1994))。这样的被转化的菌株的一个例子是大肠杆菌菌株 MG1655/pFE32。质粒 pFE32 含有已经掺入到载体 pBR322 中的 MG1655 的 *ilvC* 基因。这样的被转化的菌株的另一个例子是谷氨酸棒杆菌菌株 ATCC13032/pFE91。质粒 pFE91 含有已经掺入到载体 pECm3 中的 ATCC13032 的 *ilvC* 基因。质粒 pECm3 是质粒 pECm2 的衍生物(Tauch, 1994, FEMS 微生物学通讯 123: 343 - 348), 其中通过用 BglIII 和 BamHI 限制性切割随后再连接已经去除了卡那霉素抗性基因。

对于将突变掺入到 *ilvC* 基因以去除其功能, 例如可以将缺失或插入掺入其中。为了产生缺失, 借助于合适的限制性酶, 随后连接形成的末端可以去除结构基因的核苷酸序列的内部部分。以这种方式突变的 *ilvC* 基因没有功能。以相同

的方式可以将编码对抗生素的抗性的第二个基因掺入到 *ilvC* 基因。以这种方式突变的 *ilvC* 基因也没有功能。然后可以将以这种方式突变的 *ilvC* 基因导入到微生物并与其中的染色体上的野生型基因交换。怎样进行基因交换的方法在文献中是已知的。对于大肠杆菌，可以使用由 Hamilton 等人描述的方法(细菌学杂志 171, 4617-4622(1989))，该方法是基于质粒 pSC101 的温度敏感性复制突变体。这样的质粒是例如 pMAK705。对于谷氨酸棒杆菌，可以使用由 Schwarzer 和 Puhler 描述的基因交换的方法(生物/技术 9, 84-87(1991))，其中使用了非复制性质粒载体。对于啤酒酵母，有 Roca 等人描述的受控制的基因交换的方法(核酸研究 20(17), 4671-4672(1992))。

如下描述例如从野生型 *ilvC* 基因制备突变的 *ilvC* 基因。质粒 pFE32 由 pBR322 组成。其中野生型 *ilvC* 基因掺入到 BamHI 的限制性裂解位点。编码对抗生素庆大霉素抗性的 *aacC1* 基因已经被掺入到 pFE32 的 *ilvC* 基因的 KpnI 裂解位点(Schweizer, 生物技术 15(5), 831-834(1993))。以这种方式获得的质粒 pFE33 含有 *ilvC* : *aacC1* 等位基因，它不能再形成功能性 *ilvC* 基因产物。从质粒 pFE33 去除 *ilvC* : *aacC1* 等位基因并且导入到质粒 pMAK705 的 SphI 裂解位点，结果形成了质粒 pDB1。质粒 pDB1 是能够等位基因交换并且一方面含有 pMAK705 另一方面含有 *ilvC* : *aacC1* 等位基因的质粒载体。质粒 pDB1 被用于由 Hamilton 等人描述的方法以便把存在于 MG1655 中的野生型 *ilvC* 基因换成 *ilvC* : *aacC1* 等位基因。以这种方式形成的菌株已经被称之为 FE4。

为了分离在 *panE* 基因中携带突变的 FE4 突变体，将菌株 FE4 用转座子 Tn5 进行转座子诱变。转座子 Tn5 由 Auerswald 描述(关于定量生物学的冷泉港年会 45, 107-113(1981))。转座子诱变的方法描述于例如 Miller 的手册, A: 细菌遗传的短训班，对于大肠杆菌及相关细菌的实验室手册(冷泉港实验室出版社, 1992)。此外该方法进一步由 Simon 描述(基因 80, 161-169(1998))并也描述于 Hagemann 的手册: 遗传工程的操作方法(Gustav Fischer 出版社, 1990)和易于被公众获得的许多其它的出版物。此外在用紫外线诱变之后或在用诱导突变的化学药剂例如 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍处理之后也可以制备突变体。在以这种方式获得的突变体中，在测试生长物质的需求之后，特别是对泛酸的需求之后，可以分离在泛酸的生物合成基因中携带突变的那些突变体。需要泛酸的那些突变体是特别有益的，这些突变体不利用酮泛解酸盐作为生长物质，而

是利用泛解酸盐作为生长物质并且因此在编码酮泛解酸盐还原酶(EC 1. 1. 1169)的 *panE* 基因中发生突变。这样的例子是以这种方式获得的 FE5 菌株, 该菌株除了携带 *ilvC::aacC1* 突变以外, 还携带 *panE::Tn5* 突变。

可以将 *ilvC* 和 *panE* 基因中携带缺陷突变的微生物, 例如大肠杆菌 FE5 菌株用作用于分离 *ilvC* 基因和特别有益的 *panE* 基因或编码具有酮泛解酸盐还原酶活性的蛋白质的核苷酸序列的克隆宿主。

在本发明中已经建立了有益的微生物的基因文库。基因文库的建立描述于通常已知的教科书和手册。可以提到的例子是 Winnacker: 从基因到克隆, 基因技术的介绍(化学出版社, Weinheim, 德国, 1990)教科书或由 Sambrook 等人: 分子克隆, 实验室手册(冷泉港实验室出版社, 1989)。已知的基因文库是由 Kohara 等人建立的大肠杆菌 K-12 菌株 W3110(细胞 50, 495-508(1987))。由于获得各种商业微生物的基因文库已经成为可能, 例如质粒  $\lambda$  FIX II(Elgin, *Strategies* 4: 6-7 (1991))中的来自于 Stratagene 公司(Heidelberg, 德国)粟酒酵母菌株 Sp63 的基因文库, 质粒 pGAD10(Kitts, CLONTECH(Heidelberg, 德国)Disc 版本 1.3, 1994 上的载体)上的来自于 CLONTECH 公司(Heidelberg, 德国)的大肠杆菌菌株 W1485 的基因文库, 其核苷酸序列根据基因文库入藏号 U13188 可获得。通过转化可将上面描述的方式制备的基因文库导入到上面描述的宿主 FE5。借助于实施例, 由此通过转化将 W1485 的 pGAD10 基因文库导入到菌株 FE5, 并且调查获得的转化体在没有泛酸的营养培养基上的生长能力。通过测定核苷酸序列可以调查包含于获得的泛酸原养型转化体的质粒 DNA 的插入。例如可以在 Sanger 等人(美国国家科学院院报 74: 5463-5467(1977))阅读到测定核苷酸序列的方法。借助于同源调查将核苷酸序列指定到基因配套。该同源性检索的一种可能性是与 EMBL 和基因文库数据库进行比较, 可借助于 BLAST E-mail 服务进行这样的比较(Altschul, 分子生物学杂志 215, 403-410(1990))。这样的转化体的例子是携带大肠杆菌菌株 MG1655 的 *panE* 基因的大肠杆菌菌株 FE5/pFEbank16。

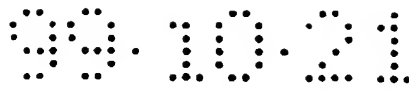
然后将以所描述的方式分离和鉴定的 *panE* 基因在所需的微生物中表达。对此, 由质粒载体扩增该基因。再次给这些基因装配信号结构, 确保有效转录和翻译。在 Winnacker: 从基因到克隆, 基因技术的介绍(化学出版社, Weinheim, 德国, 1990)教科书或由 Sambrook 等人: 分子克隆, 实验室手册(冷泉港实验室出

版社, 1989) 中可以发现表达载体的综述。此外将表达信号, 例如 tac 启动子掺入到染色体的 panE 基因的上游。这样的方法描述于 W098/04715。可以从克隆的染色体 DNA 片段去除待表达的 panE 基因, 或再次借助于聚合酶链反应可以将其扩增。借助于由 Shimizu 等人描述的方法可以测定存在于所需的微生物中的酮泛解酸盐还原酶的量(生物化学杂志 263: 12077 - 12084(1988))。这样的菌株的例子是大肠杆菌菌株 MG1655/pFE65。质粒 pFE65 由载体 pKK223-3 组成, 其中已经将大肠杆菌 MG1655 的 panE 基因掺入到 EcoRI 限制性裂解位点。

根据本发明, 已经证明扩增尤其是过量表达除了编码酮泛解酸盐还原酶的 panE 基因的泛酸生物合成途径中一个或多个基因是有利的。这些包括编码酶酮泛解酸盐羟基甲基转移酶(EC 4. 1. 2. 12), 天冬氨酸 1-脱羧基酶(EC 4. 1. 1. 11)和泛酸盐合成酶(EC 6. .3. .2. 1)的基因。对于大肠杆菌, 这些基因携带名称为 panB, panD 和 panC(Miller, 细菌遗传学短训班, 大肠杆菌和有关的细菌的实验室手册(冷泉港实验室出版社, 1992))。对此可以将该基因掺入到各种相容性质粒载体中。由 Bartolome 等人描述了这些载体的例子(基因 102, 75-78(1991))。此外通过改变位于上游的染色体信号结构可以提高基因表达。此外可以将所需基因置于公用的启动子的控制下, 连续地排列, 并且掺入到质粒载体和导入到合适的微生物中。这样的例子是大肠杆菌菌株 MG1655/pFE80。质粒 pFE80 由质粒 pKK223-3 组成, 它在所述的序列中含有 panB, panD, panC 和 panE。tac 启动子包含于 pFE80 中作为 panB 基因的上游的表达信号。

此外, 已经证明在含有染色体突变的宿主菌株中过量表达 panE 基因和由基因 panB, panD, panC 和 panE 组成的表达单位是有利的。

单独地或一起使用具有对代谢产物例如 L-缬氨酸或 $\alpha$ -酮异戊酸或对代谢产物的类似物例如 $\beta$ -羟基天冬氨酸或 O-甲基苏氨酸有抗性作用的突变是可能的。这样的突变体自发地出现或在用紫外线诱变之后或在用诱导突变的化学药剂例如 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍处理之后也可以产生, 然后在含有相应的物质的琼脂平板上选择这些突变体。用于诱导突变和用于选择的方法通常是已知的并且可以在例如 Miller 上阅读到(细菌遗传学短训班, 大肠杆菌和有关的细菌的实验室手册(冷泉港实验室出版社, 1992))或在美国细菌协会的“普通细菌学的手册和方法”(Washington D. C. 美国)手册上阅读到。这样的突变体的例子是大肠杆菌 FE6, 它们已经作为自发出现的, 菌株 MG1655 的 L-缬氨酸抗

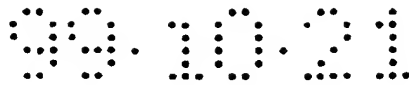


性突变体分离获得。

此外，以受控制的方式去除了染色体编码的不利的或麻烦的代谢反应。对此，在相应的基因中导入插入或缺失并且将以这种方式形成的突变的基因或等位基因掺入到所需宿主的染色体中。可以使用上面已经描述的用于突变 *ilvC* 基因的方法。这样的突变体的例子是大肠杆菌 FE7 菌株，它在染色体中携带 *avtA::aadB* 突变。这是菌株 MG1655，其中来自于质粒 pHP45 $\Omega$  的 *aadB* 基因已经被导入到 *avtA* 基因中，该基因负责对链霉素的抗性 (Prentki 和 Krisch, 基因 29, 303 - 313 (1984))。然后在以这种方式制备的宿主菌株中过量表达 *panE* 基因本身或其它基因结合表达。这些例子是菌株 FE6/pFE80 和 FE7/pFE80。

根据本发明制备的微生物可以在分批工艺或在补料分批工艺 (补料工艺) 或重复的补料分批工艺 (重复补料工艺) 中连续地或不连续地培养以生产泛酸。已知的培养方法的概述描述于 Chmiel (生物工艺技术 1. 生物工艺技术的介绍 (Gustav Fischer 出版社, Stuttgart, 1991)) 的教科书或在 Storhas (生物反应器和外围设备) (Vieweg 出版社, Braunschweig/Wiesbaden, 1994) 的教科书。所使用的培养基必需以合适的方式满足特定的微生物的需要。用于各种微生物的培养基的描述包含于美国细菌学协会的手册“普通细菌学方法的手册” (Washington D. C. 美国, 1981) 中。糖和碳水化合物，例如葡萄糖，蔗糖，乳糖，果糖，麦芽糖，糖蜜，淀粉和纤维素，油和脂肪，例如豆油，葵花油，花生油和椰子油，脂肪酸，例如棕榈酸，硬脂酸和亚油酸，醇，例如甘油和乙醇，和有机酸，例如乙酸可用作碳源。这些物质可以被单独或以混合物形式使用。含有有机氮的混合物，例如豚，酵母提取物，肉提取物，麦芽提取物，玉米提取液，大豆粉和豚，或无机化合物例如硫酸铵，氯化铵，磷酸铵，碳酸铵和硝酸铵可以用作为氮源。氮源可以以单独或以混合物形式使用。可以将磷酸，磷酸二氢钾或磷酸氢二钾或相应的含有钠的盐用作为磷源。此外培养基必需还包括生长所必需的金属盐，例如硫酸镁或硫酸铁。最后，除了上面提到的物质外可以使用必要的生长物质，例如氨基酸和维生素。此外可向培养基中加入泛酸的前体例如  $\beta$ -丙氨酸或酮泛解酸和其盐。可在单个的分批工艺中向培养物中加入提到的起始物质或在以合适的方式培养期间补料。

可以以合适的方式使用碱性化合物，例如氢氧化钠，氢氧化钾，氨。或酸性化合物，例如磷酸或硫酸以控制培养物的 pH。可以使用消沫剂，例如脂肪酸聚



乙二醇酯或硅油以控制泡沫的产生。可以向培养基中加入具有选择性作用的合适的物质，例如抗生素以维持质粒的稳定性。为了维持好氧条件，将氧气或含氧气的气体混合物，例如空气导入到培养物。通常培养物的温度是 20 - 50℃，优选的是 25℃ - 45℃。连续进行培养直到形成最大量的泛酸。通常在 10 小时到 160 小时内达到目的。

通过已知的方法可以测定所形成的泛酸的浓度 (Velisek; 层析科学 60, 515 - 560 (1992))。

根据布达佩斯条约的规定，下面的微生物已经保藏于德国微生物和细胞培养物保藏所，Braunschweig, 德国 (DSMZ)：

- 大肠杆菌 K12 菌株 FE5, 保藏号 DSM12378
- 大肠杆菌 K12 菌株 MG1655/pFE32, 保藏号为 DSM12413
- 大肠杆菌 K12 菌株 MG1655/pFE65, 保藏号为 DSM12382
- 大肠杆菌 K12 菌株 MG1655/pFE80, 保藏号为 DSM12414
- 大肠杆菌 K12 菌株 FE6, 保藏号 DSM12379
- 大肠杆菌 K12 菌株 FE7, 保藏号 DSM12380

本发明的方法给本领域内普通技术人员提供了通过以受控制的方式改善泛酸的形成的新的措施。

#### 附图说明

附图 1: 质粒 pDB1 的图示

附图 2: 质粒 pGAD10 的图示

附图 3: 质粒 pFEbank16 的图示

附图 4: 质粒 pFE32 的图示

附图 5: 质粒 pFE65 的图示

附图 6: 质粒 pFE80 的图示

附图 7: 质粒 pFE91 的图示

附图 8: 质粒 pJDCEX2 的图示

附图 9: 质粒 pJD - YHR063c 的图示

所注明的碱基对编号是在再现性章节中获得的近似值。

在附图中使用的简写具有下面的含义：

rrnBT1T2: rrnB 基因的转录终止子

Ptac: tac 启动子

P AHD1: 来自于啤酒酵母的 ADH1 基因的启动子

T ADH1: 来自于啤酒酵母的 ADH1 基因的终止子

repts: 热敏感性复制起点

ilvC: ilvC 基因的编码区域

ilvC': ilvC 基因的 5' 区域

'ilvC: ilvC 基因的 3' 区域

panB: panB 基因的编码区

panC: panC 基因的编码区

panD: panD 基因的编码区

panE: panE 基因的编码区

Amp: 氨苄青霉素抗性基因

tet': tet 基因的 5' 区域

'tet: tet 基因的 3' 区域

Cm: 氯霉素抗性基因

Gm: 庆大霉素抗性基因

Gal4: 来自于啤酒酵母的半乳糖诱导型基因的调节子

bps: 碱基对

LEU2: 啤酒酵母的  $\beta$ - 异丙基苹果酸脱氢酶基因

2 $\mu$ : 啤酒酵母的内源性 2 $\mu$  质粒的序列

Ap<sup>R</sup>:  $\beta$ -内酰胺酶基因

P-CUP1: 啤酒酵母 CUP1 基因 (金属硫蛋白) 的启动子

T-CYC1: 啤酒酵母的 CYC1 基因 (细胞色素 C) 的终止子

ORF: 开放读框

SD: Shine-Dalgarno 序列

EcoRI: 限制性酶 EcoRI 的裂解位点

EcoRV: 限制性酶 EcoRV 的裂解位点

HincII: 限制性酶 HincII 的裂解位点

HindIII: 限制性酶 HindIII 的裂解位点

KpnI: 限制性酶 KpnI 的裂解位点

### SalI: 限制性酶 SalI 的裂解位点

**SmaI: 限制性酶 SmaI 的裂解位点**

### SphI: 限制性酶 SphI 的裂解位点

### PvuII: 限制性酶 PvuII 的裂解位点

NotI: 来自于 *Norcardia otitidis-cavarium* 种的限制性酶 NotI 的裂解位点

**SpeI:**来自于球衣菌种的限制性酶 SpeI 的裂解位点

**XbaI:** 来自于巴氏黄单胞菌的限制性酶 XbaI 的裂解位点

**PstI:** 来自于斯氏普罗威登斯菌的限制性酶 PstI 的裂解位点

## 实施例

下面借助于实施方案更详细地解释了本发明。

## 实施例 1

### 大肠杆菌 K12 菌株 MG1655 的 *ilvC::aacC1 panE::Tn5* 突变体的制备

### 1. *ilvC::aacC1* 突变体的制备

从大肠杆菌 K12 菌株 MG1655 的 *ilvC* 基因的核苷酸序列开始 (EMBL - 基因文库: 入藏号 M87049), 合成 PCR 引物 (MWG Biotech (Ebersberg, 德国)). 采用 Innis 等人的标准的 PCR 方法用这些引物可以扩增大小约 1500 碱基对的 DNA 片段 (PCR 方案, 方法和应用导论, 1990, 学术出版社). 借助于 NucleoSpin C+T 试剂盒来分离用于 PCR 的染色体大肠杆菌 K12 MG1655 DNA (Macherey-Nagel (Düren, 德国), NucleoSpin C+T 产品的描述, Cat. no 740952). 通过在 0.8% 琼脂糖凝胶上进行凝胶电泳 (30 分钟, 10V/cm) 分离测定大小.

来自于大肠杆菌的 *ilvC* 基因的 PCR 引物:

ilvC1      5' - AGAAGCACAACATCACGAGG      - 3'

**ilvC2**      5' - CTCCAGGAGAAGGCTTGAGT      - 3'

将 ilvC 基因的 PCR 产物转化到质粒 pCR®2.1 和转化到大肠杆菌菌株 TOP10F' 中 (Invitrogen (Leek, 荷兰), 产品描述原始的 TA 克隆®试剂盒, Cat. no. KNM2030-01).

通过用限制性酶EagI (Pharmacia Biotech (Freiburg, 德国), 产品描述EagI,

密码号 27-0885-01), EcoRI (Pharmacia Biotech(Freiburg, 德国), 产品描述, EcoRI, 密码号 27-0884-03) 和 KpnI (Pharmacia Biotech(Freiburg, 德国), 产品描述 KpnI, 密码号 27-0908-01) 裂解质粒 pCR®2.1ilvC 的 DNA 证实成功地进行克隆。对此, 借助于 QIAprep Spin 质粒试剂盒(QIAGEN(Hilden, 德国), Cat. no. 27106 )和在裂解之后, 在 0.8%琼脂糖凝胶上(30 分钟, 10V/cm)分离质粒 DNA。

为了从质粒 pCR®2.1ilvC 分离 ilvC 基因, 用酶 HindIII(Pharmacia Biotech(Freiburg, 德国), 产品描述 HindIII, 密码号 27-0860-01)和 XbaI(Pharmacia Biotech(Freiburg, 德国), 产品描述 XbaI, 密码号 27-0948-01)裂解分离的质粒 DNA, 将该批裂解产物在 0.8%琼脂糖凝胶上(30 分钟, 10V/cm)分离和借助于 GLASSMAX™ 试剂盒(GIBCO BRL(Eggenstein, 德国), 产品描述 GLASSMAX™ Spin 药桶, Cat. no. 15590-052)分离 1.5 千碱基对 ilvC 片段。借助于 T4 DNA 连接酶(Pharmacia Biotech(Freiburg, 德国), 产品描述 T4 DNA 连接酶, 密码号 27-0870-03), 将也用 HindIII 和 XbaI(Hamilton 等人, 细菌学杂志 1989, 171: 4617-4622)裂解的质粒 pMAK705 与分离的 ilvC 片段连接, 用该分批连接产物(Tauch, FEMS 微生物通讯 1994, 123: 343-347)电穿孔大肠杆菌菌株 DH5αmcrr (Grant, 国家科学院院报 1990, 87:4645-4649)。通过将电穿孔分批产物铺在 LB 琼脂(Lennox, 病毒学 1955, 1: 190)上进行携带质粒的细胞的选择, 向所述培养基中已经加入 25 微克/毫升氯霉素(Sigma(Deisenhofen, 德国)密码号 C0378), 在 30℃培养 24 小时。在 DNA 分离和 在一个克隆中检测用酶 HindIII, XbaI 和 KpnI 酶控制裂解之后, 随后在 0.8%琼脂糖凝胶上进行凝胶电泳(30 分钟, 10V/cm)鉴定需要的质粒, 并且称之为 pFE30。

为了从质粒 pFE30 分离 ilvC 基因, 用 酶 BamHI (Pharmacia Biotech(Freiburg, 德国), 产品描述 BamHI, 密码号 27-0868-03)裂解分离的质粒 DNA, 将该批裂解产物在 0.8%琼脂糖凝胶上(30 分钟, 10V/cm)分离和借助于 GLASSMAX™ 试剂盒分离 1.5 千碱基对 ilvC 片段。借助于 T4 DNA 连接酶, 将也用 BamHI(Sutcliffe, 关于定量生物学的冷泉港年会 1979, 43: 77-90)裂解的质粒 pBR322 连接分离的 ilvC 片段, 用该连接产物电穿孔大肠杆菌菌株 DH5αmcrr。通过将电穿孔分批产物在 LB 琼脂上平板培养进行携带质粒的细胞的

选择, 向所述培养基中已经加入100微克/毫升氨苄青霉素(Sigma(Deisenhofen, 德国)密码号 A9518), 在 37℃ 培养 24 小时. 将所获得的菌落平行接种到 LB + 氨苄青霉素琼脂和 LB + (5 微克/毫升)四环素(Sigma(Deisenhofen, 德国), 密码号 T3383). 用 QIAprep Spin 质粒试剂盒分离四环素敏感的菌落并且借助于 BamHI 和 KpnI 裂解和随后在 0.8%琼脂糖凝胶上进行分离(30 分钟, 10V/cm)验证成功的克隆. 所构建的质粒称之为 pFE32.

将 aacC1 基因克隆到 pFE32 质粒的 KpnI 裂解位点, 将获得的质粒称之为 pFE33. 对此, 从琼脂糖凝胶分离 aacC1 基因(30 分钟, 10V/cm), 其中分离了质粒 pMS255(Becker, 基因 1995, 162: 37 - 39)的 KpnI 限制性分批产物. 用 T4 DNA 连接酶进行连接. 在将该分批连接产物电击穿到菌株 DH5αmcrr 之后, 在 PA 琼脂(Sambrook, 分子克隆, 第 2 版, 冷泉港, 1989)上选择转化体, 其中琼脂中加入了 10 微克/毫升庆大霉素(Sigma(Deisenhofen, 德国), 密码号 G3632). 用 QIAprep Spin 质粒试剂盒分离庆大霉素抗性的菌落的 DNA 并且借助于 BamHI 和 KpnI 裂解和随后在 0.8%琼脂糖凝胶上进行分离(30 分钟, 10V/cm)验证成功的克隆.

借助于 SphI(Pharmacia Biotech(Freiburg, 德国), 产品描述 SphI, 密码号 27 - 0951 - 01)限制性裂解从质粒 pFE33 裂解 ilvC:: aacC1 片段, 在 0.8%琼脂糖凝胶上进行分离(30 分钟, 10V/cm)和用 GLASSMAX™ 试剂盒分离. 将经 SphI 裂解的质粒 pMAK705 借助于 T4 DNA 连接酶与该片段连接, 用该分批连接产物电穿孔菌株 DH5αmcrr. 通过在 PA + 庆大霉素琼脂上 30℃ 培养 24 小时选择转化体. 用 QIAprep Spin 质粒试剂盒分离庆大霉素抗性的菌落的 DNA 并且借助于 SphI 和 EcoRI 裂解产物在 0.8%琼脂糖凝胶上进行分离(30 分钟, 10V/cm)验证成功的克隆. 所构建的质粒称之为 pDB1.

借助于质粒 pDB1 用间断的 ilvC:: aacC1 片段替换菌株大肠杆菌 K12 MG1655 的染色体 ilvC 基因. 根据 Hamilton 等人的改进方法用于进行基因交换. 将质粒 pDB1 电穿孔到大肠杆菌 K12 MG1655 菌株中, 然后在 LB - 氯霉素琼脂上在 42℃ 培养转化体 24 小时, 用于选择共整合子. 对于单个化, 再次将获得的菌落涂抹在相同的培养基上并且在 42℃ 培养 24 小时, 为了分解质粒, 在 5 毫升 LB 液体培养基上 42℃ 培养单个的菌落 24 小时. 然后将连续稀释的液体培养基涂抹在 LB - 氯霉素琼脂上平板培养. 将连续稀释液在 30℃ 培养 24 小时. 对于质粒

的清除, 以 3 次连续的单个菌落涂抹将从连续稀释液获得的单个菌落在 42℃ 培养在 LB 琼脂上, 每次 24 小时。为了检测表型, 将获得的单个菌落平行接种到具有下面的培养基的琼脂平板上: 培养基 E(Vogel, 生物化学杂志 1956, 218: 97 - 106) + 葡萄糖(0.4%), 培养基 E + 葡萄糖(0.4%) (Sigma(Deisenhofen, 德国) 密码号 G8270) + 50 微克/毫升异亮氨酸 (Sigma (Deisenhofen, 德国) 密码号 I7268), 培养基 E + 葡萄糖 (0.4%) + 50 微克酮异戊酸 (ICN(Eschwege, 德国), 密码号 151395), 培养基 E + 葡萄糖(0.4%) + 50 微克/毫升异亮氨酸 + 50 微克酮异戊酸, PA 培养基 + 庆大霉素和 LB 培养基 + 氯霉素。将这些培养基在 37℃ 培养 48 小时。测试 150 个单个菌落, 其中之一表型显示以 *ilvC::aacC1* 片段交换了染色体的 *ilvC* 基因。该菌株称之为 FE4。

## 2. *ilvC::aacC1 panE::Tn5* 双突变体的制备

将菌株 FE4 在 5 毫升的 LB 液体培养基 + 10mM 硫酸镁 + 0.2% 麦芽糖 (Sigma(Deisenhofen, 德国) 密码号 M5885) (LBMgMal) 上, 37℃ 培养到 0.5 的光密度。用 Pharmacia(Freiburg, 德国) NovaspecII 光度计在波长 660nm 处测量光密度, 以 3000rpm 将 2 毫升的细菌溶液离心 5 分钟 (Beckmann J2-21 型离心机, JA-17 转子)。在将沉淀吸取到 0.5 毫升的 LBMgMal 液体培养基之后, 将 30 微升  $\lambda::Tn5$  (Simon, 基因 1989, 80(1):161-169) 裂解液, 约  $10^8$  噬菌体加入到该悬浮液。采用 Hagemann 的方法 (遗传工程: 操作方法, Gustav Fischer 出版社, 1990: 14-18) 从大肠杆菌菌株 K12 C600 (Appleyard, 遗传学 1954, 39:440-452) 分离裂解液。具有  $\lambda::Tn5$  裂解液的悬浮液在 30℃ 培养 45 分钟。在以 3000rpm 离心 5 分钟之后, 将沉淀吸取到 10 毫升的 PA + 10mM 焦磷酸盐和 37℃ 培养 3 小时。将细菌溶液连续稀释液涂抹在培养基 E 琼脂 + 葡萄糖(0.4%) + 25 微克/毫升卡那霉素 + 50 微克/毫升异亮氨酸 + 50 微克/毫升酮异戊酸 + 50 微克/毫升泛酸盐上平板培养和在 37℃ 培养 48 小时。将单个菌落平行接种到培养基 E 琼脂 + 葡萄糖(0.4%) + 25 微克/毫升卡那霉素 + 50 微克/毫升异亮氨酸 + 50 微克/毫升酮异戊酸 + 50 微克/毫升泛酸盐和接种到培养基 E 琼脂 + 葡萄糖(0.4%) + 25 微克/毫升卡那霉素 + 50 微克/毫升异亮氨酸 + 50 微克/毫升酮异戊酸和在 37℃ 培养 48 小时。在接种的 14000 单个菌落, 鉴定一个称之为 FE5 的菌落是可能的, 该菌落在培养基 E 琼脂 + 葡萄糖(0.4%) + 25 微克/毫升卡那霉素 + 50 微克/毫升异亮氨酸 + 50 微克/毫升酮异戊酸 + 50 微克/毫升泛酸盐上生长但

是不在培养基 E 琼脂 + 葡萄糖(0.4%) + 25 微克/毫升卡那霉素 + 50 微克/毫升异亮氨酸 + 50 微克/毫升酮异戊酸上生长。

### 3. 菌株 FE4 和 FE5 的鉴定

将野生型菌株, FE4 和 FE5 与携带突变的 *panB* 基因的大肠杆菌菌株 SJ2(Jakowski, Genetic Stock center, 耶鲁大学), 携带突变的 *panC* 基因的 MW6(Williams, Genetic Stock center, 耶鲁大学)和携带突变的 *panD* 基因的 DV9(Vallari, 细菌学杂志 1985, 164: 136 - 142)一起涂抹到各种补充的基本培养基(培养基 E 琼脂 + 葡萄糖(0.4%) + 50 微克/毫升异亮氨酸 + 50 微克/毫升酮异戊酸; 和对于 SJ2, DV9 和 MW6, 另外加入 50 微克/毫升硫胺素)并且在 37℃ 培养 48 小时。将泛酸盐(钙盐), 酮泛解酸盐(钠盐),  $\beta$ -丙氨酸(Sigma(Deisenhofen, 德国)密码号 A7752)和泛解酸盐(钾盐)用作为另外的增补剂。通过在 60℃ 用等摩尔量的氢氧化钠处理和随后蒸发从 ketopantolactone 制备酮泛解酸盐。采用 Ojima 等人的方法(有机合成 63, 18(1985))合成 ketopantolactone。采用 Primerano 和 Burns 的方法(细菌学杂志 1983, 153:259 - 269)从 pantoyllacton(Sigma(Deisenhofen, 德国)密码号 P2625)制备泛解酸盐。生长测试的结果(表 1)显示菌株 FE4 在所用的具有各种增补剂的基本培养基上生长。菌株 FE5 仅在加入了泛酸盐或泛解酸盐上生长, 但是在加入了酮泛解酸盐的基本培养基上不生长。

表 1

菌株	加入基本培养基的增补剂				
	没有	$\beta$ -丙氨酸 (50 微克/毫升)	酮 泛解酸盐 (50 微克/毫升)	泛解酸盐 (50 微克/毫升)	泛酸盐 (50 微克/毫升)
MG1655	+	+	+	+	+
SJ2	-	-	+	+	+
MW6	-	-	-	-	+
DV9	-	+	-	-	+
FE4	+	+	+	+	+
FE5	-	-	-	+	+



+ = 生长

- = 没有生长

## 实施例 2

### 从大肠杆菌 K12 菌株 W1485 分离 panE 基因

将大肠杆菌 K12 W1485 MATCHMAKER 基因组文库 (CLONTECH (Heidelberg, 德国), 密码号 XL4001AB) 电穿孔到菌株 FE5。大肠杆菌 K12 MATCHMAKER 基因组文库含有质粒 pGAD10 上的平均 1.0 千碱基对的插入物形式的大肠杆菌 K12 W1485 的染色体 DNA, 其中单个插入物的大小为 0.5–3.0 千碱基对 (CLONTECH (Heidelberg, 德国)。通过将转化体涂抹到培养基 E 琼脂 + 葡萄糖 (0.4%) + 100 微克/毫升氨苄青霉素 + 50 微克/毫升异亮氨酸 + 50 微克/毫升酮异戊酸平板上培养进行选择。借助于 QIAprep Spin 质粒试剂盒从 20 个获得的菌落分离质粒 DNA。通过用 EcoRI 裂解质粒 DNA 和随后在 0.8% 琼脂糖凝胶上进行分离 (30 分钟, 10V/cm), 证明质粒是具有不同大小插入物的 20 个 pGAD10 载体。通过与 BLAST 程序进行同源性比较 (Altschul, 分子生物学杂志 1990, 215: 403–410), 对插入物进行测序 (IIT Biotech (Bielefeld, 德国)) 显示, 在 7 种情况下, 插入物含有整个 ilvC 基因, 在 13 种情况下, 含有开放读框, 所述读框描述为“与鼠伤寒沙门氏菌 apbA 类似” (EMBL – 基因文库: 入藏号 U82664)。该开放读框称之为 panE。

## 实施例 3

### 大肠杆菌 ilvC 基因在大肠杆菌 K12 菌株 MG1655 中过量表达

为了过量表达 ilvC 基因, 使用了质粒 pFE32 (参见实施例 1)。在质粒 pFE32 中, ilvC 基因的编码区处于由质粒 pBR322 编码的 tet 启动子的控制下。将质粒 pFE32 电穿孔到菌株大肠杆菌 K12 MG1655 中并且在 LB 琼脂上选择转化体, 随后在 37°C 培养 24 小时之后, 向其中加入 100 微克/毫升的氨苄青霉素。获得的菌株称之为 MG1655/pFE32。

## 实施例 4

### 大肠杆菌 panE 基因在大肠杆菌 K12 菌株 MG1655 中过量表达

从大肠杆菌 K12 菌株 MG1655 的 panE 基因的核苷酸序列开始, 合成 PCR 引物 (MWG Biotech (Ebersberg, 德国))。采用标准的 PCR 方法用这些引物可以从大



肠杆菌 K12 菌株 MG1655 的染色体 DNA 扩增大小约 1000 碱基对的 DNA 片段。借助于 NucleoSpin C+T 试剂盒分离用于 PCR 的染色体大肠杆菌 K12 MG1655 DNA。通过在 0.8% 琼脂糖凝胶上进行凝胶电泳 (30 分钟, 10V/cm) 分离测定大小。

来自于大肠杆菌的 panE 基因的 PCR 引物:

panE1      5' - AGGAGGACAATGAAAATTAC      - 3'

panE2      5' - TCAGTCTCTTCACTACCAGG      - 3'

将 panE 基因的 PCR 产物转化到质粒 pCR®2.1 和转化到大肠杆菌菌株 TOP10F' (Invitrogen (Leek, 荷兰), 产品描述原始的 TA 克隆®试剂盒, Cat. no. KNM2030-01)。通过用限制性酶 EcoRI 和 HincII (Pharmacia Biotech (Freiburg, 德国), 产品描述 HincII, 密码号 27-0858-01) 裂解质粒 pCR®2.1panE 的 DNA 证实成功地进行克隆。对此, 借助于 QIAprep Spin 质粒试剂盒和在裂解之后, 在 0.8% 琼脂糖凝胶上 (30 分钟, 10V/cm) 电泳分离质粒 DNA。

为了从质粒 pCR®2.1 panE 分离 panE 基因, 用酶 EcoRI 裂解分离的质粒 DNA, 将该批裂解产物在 0.8% 琼脂糖凝胶上 (30 分钟, 10V/cm) 分离和借助于 GLASSMAX™ 试剂盒分离 1.0 千碱基对 panE 片段。借助于 T4 DNA 连接酶, 将也用 EcoRI 裂解的质粒 pKK223-3 与分离的 panE 片段连接, 用该分批连接产物电穿孔大肠杆菌菌株 DH5αcmcr。通过将电穿孔分批产物铺在 LB 琼脂上进行携带质粒的细胞的选择, 向所述培养基中已经加入 100 微克/毫升氨苄青霉素, 在 37℃ 培养 24 小时。在 DNA 分离和在一个克隆中检测用酶 EcoRI 和 HincII 裂解之后, 随后在 0.8% 琼脂糖凝胶上进行凝胶电泳 (30 分钟, 10V/cm) 可鉴定需要的质粒, 并且称之为 pFE65。

在质粒 pFE65 中, panE 基因的编码区处于由质粒 pKK223-3 编码的 tac 启动子的控制下。将质粒 pFE65 电穿孔到菌株大肠杆菌 K12 MG1655 中并且在 LB 琼脂上选择转化体, 随后在 37℃ 培养 24 小时之后, 向琼脂加入了 100 微克/毫升的氨苄青霉素。获得的菌株称之为大肠杆菌 K12MG1655/pFE65。

#### 实施例 5

在大肠杆菌 K12 菌株 MG1655 中将大肠杆菌的 panE 基因

与大肠杆菌的 panB, panC 和 panD 一起过量表达

从大肠杆菌 K12 菌株 MG1655 的 panB 基因, panC 基因和 panD 基因的核苷酸

序列 (EMBL - 基因文库入藏号: L17086) 开始, 合成 PCR 引物 (MWG Biotech(Ebersberg, 德国)). 采用标准的 PCR 方法用 panB 引物可以从大肠杆菌 K12 菌株 MG1655 的染色体 DNA 扩增大小约 800 碱基对的 DNA 片段, 用 panD 引物扩增大小约 400 碱基对的 DNA 片段. 采用改进的标准的 PCR 方法用 panC 引物可以从大肠杆菌 K12 菌株 MG1655 的染色体 DNA 扩增大小约 850 碱基对的 DNA 片段. 由 Pfu 聚合酶替代 Taq 聚合酶并且因此修饰了 PCR 分批处理的缓冲条件 (STRATAGENE(Heidelberg, 德国), 产品描述 Pfu 聚合酶, 密码号 600135). 借助于 NucleoSpin C+T 试剂盒分离用于 PCR 的染色体大肠杆菌 K12 MG1655 DNA. 通过在 0.8%琼脂糖凝胶上进行凝胶电泳(30 分钟, 10V/cm)分离测定所有扩增的产物的大小.

来自于大肠杆菌的 panB 基因的 PCR 引物:

panB1      5' - AGGATACGTTATGAAACCGA      - 3'

panB2      5' - ACAACGTGACTCCTTAATGG      - 3'

来自于大肠杆菌的 panC 基因的 PCR 引物:

panC1      5' - AGGAGTCACGTTGTGTTAAT      - 3'

panC2      5' - AAGTATTACGCCAGCTCGAC      - 3'

来自于大肠杆菌的 panD 基因的 PCR 引物:

panD1      5' - AGGTAGAAGTTATGATTCGC      - 3'

panD2      5' - TAACAATCAAGCAACCTGTA      - 3'

将 panB 基因的 PCR 产物转化到质粒 pCR®2.1 和转化到大肠杆菌菌株 TOP10F' (Invitrogen(Leek, 荷兰)). 通过用限制性酶 EcoRI, EcoRV (Pharmacia Biotech(Freiburg, 德国), 产品描述 EcoRV, 密码号 27-0934-01) 和 PvuII (Pharmacia Biotech(Freiburg, 德国), 产品描述 PvuII, 密码号 27-0960-01) 裂解质粒 pCR®2.1panB 的 DNA 证实 panB PCR 产物成功地进行克隆. 对此, 借助于 QIAprep Spin 质粒试剂盒和在裂解之后, 在 0.8%琼脂糖凝胶上(30 分钟, 10V/cm)分离质粒 DNA. 将 panD 基因的 PCR 产物转化到质粒 pCR®2.1 和转化到大肠杆菌菌株 TOP10F' (Invitrogen(Leek, 荷兰)). 通过用限制性酶 EcoRI, EcoRV 和 HincII 裂解质粒 pCR®2.1panD 的 DNA 证实 panD PCR 产物成功地进行克隆. 对此, 借助于 QIAprep Spin 质粒试剂盒和在裂解之后, 在 0.8%琼脂糖凝胶上(30 分钟, 10V/cm)电泳分离质粒 DNA. 将 panC 基因的 PCR 产

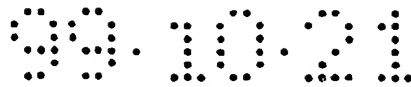


物电穿孔入质粒 pUC19(Viera, 基因 1982 19: 259 - 268)和电穿孔入大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ mc $r$ . 通过用限制性酶 EcoRI, HindIII 和 SalI(Pharmacia Biotech(Freiburg, 德国), 产品描述 SalI, 密码号 27-0882-01) 裂解质粒 pUC19panC 的 DNA 证实 panC PCR 产物成功地进行克隆. 对此, 借助于 QIAprep Spin 质粒试剂盒和在裂解之后, 在 0.8%琼脂糖凝胶上(30 分钟, 10V/cm)电泳分离质粒 DNA. 所构建的质粒称之为 pFE60.

为了从质粒 pCR $\odot$ 2.1panB 分离 panB 基因, 用酶 EcoRI 裂解分离的质粒 DNA, 将该批裂解产物在 0.8%琼脂糖凝胶上(30 分钟, 10V/cm)分离和借助于 GLASSMAX<sup>TM</sup> 试剂盒分离 800 碱基对 panB 片段. 借助于 T4 DNA 连接酶, 将也用 EcoRI 裂解的质粒 pKK223-3 与分离的 panB 片段连接, 用该分批连接产物电穿孔大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ mc $r$ . 通过将电穿孔分批产物铺在 LB 琼脂上进行携带质粒的细胞的选择, 向所述培养基中已经加入 100 微克/毫升氨苄青霉素, 在 37 $^{\circ}$ C 培养 24 小时. 在 DNA 分离和在一个克隆中检测用酶 EcoRI, EcoRV 和 PvuII 裂解之后, 随后在 0.8%琼脂糖凝胶上进行凝胶电泳(30 分钟, 10V/cm)可鉴定需要的质粒, 并且称之为 pFE40. 在质粒 pFE40 中, panB 基因的编码区处于由质粒 pKK223-3 编码的 tac 启动子的控制下.

为了从质粒 pCR $\odot$ 2.1panD 分离 panD 基因, 用酶 EcoRI 裂解分离的质粒 DNA, 将该批裂解产物在 0.8%琼脂糖凝胶上(30 分钟, 10V/cm)分离和借助于 GLASSMAX<sup>TM</sup> 试剂盒分离 400 碱基对 panD 片段. 借助于 T4 DNA 连接酶, 将也用 EcoRI 裂解的质粒 pKK223-3 与分离的 panD 片段连接, 用该分批连接产物电穿孔大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ mc $r$ . 通过将电穿孔分批产物在 LB 琼脂上平板培养进行携带质粒的细胞的选择, 向所述培养基中已经加入 100 微克/毫升氨苄青霉素, 在 37 $^{\circ}$ C 培养 24 小时. 在 DNA 分离和在一个克隆中检测用酶 EcoRI, EcoRV 和 HincII 裂解之后, 随后在 0.8%琼脂糖凝胶上进行凝胶电泳(30 分钟, 10V/cm)可鉴定需要的质粒, 并且称之为 pFE50. 在质粒 pFE50 中, panD 基因的编码区处于由质粒 pKK223-3 编码的 tac 启动子的控制下.

借助于用 HindIII-SmaI(Pharmacia Biotech(Freiburg, 德国), 产品描述 SmaI, 密码号 27-0942-01) 裂解从质粒 pFE60 分离 panC 基因, 将该批裂解产物在 0.8%琼脂糖凝胶上(30 分钟, 10V/cm)分离和借助于 GLASSMAX<sup>TM</sup> 试剂盒分离 850 碱基对 panC 片段. 借助于 T4 DNA 连接酶, 将也用 HindIII 和 SmaI 裂解



的质粒 pFE50 与分离的 panC 片段连接, 用该分批连接产物电穿孔大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ cr. 通过将电穿孔分批产物在 LB 琼脂上平板培养进行携带质粒的细胞的选择, 向所述培养基中已经加入 100 微克/毫升氯霉素, 在 37°C 培养 24 小时. 在 DNA 分离和在一个克隆中检测用酶 EcoRI, EcoRV 和 SmaI, HindIII 和 HincII 裂解之后, 随后在 0.8% 琼脂糖凝胶上进行凝胶电泳 (30 分钟, 10V/cm) 可鉴定需要的质粒, 并且称之为 pFE52. 在质粒 pFE52 中, panD 基因的编码区和 panC 基因的编码区处于由质粒 pKK223-3 编码的 tac 启动子的控制下并且形成操纵子.

将 panB 基因克隆到质粒 pFE52 的 tac 启动子之后的 EcoRI 裂解位点, 获得的质粒称之为 pFE70. 对此, 从琼脂糖凝胶分离 panB 基因 (30 分钟, 10V/cm), 其中分离了质粒 pFE40 的 EcoRI 限制性分批产物, 用 T4 DNA 连接酶进行连接. 在将连接产物电穿孔到菌株 SJ2 中后, 在培养基 E 琼脂上选择转化体, 所述培养基中已经加入了 0.4% 葡萄糖, 100 微克/毫升硫胺素和 100 微克/毫升氯霉素. 借助于 QIAprep Spin 质粒试剂盒分离来自于氯霉素抗性的菌落的 DNA 和借助于 EcoRI, EcoRV, SmaI, HindIII 和 HincII 酶裂解, 随后在 0.8% 琼脂糖凝胶上进行分离 (30 分钟, 10V/cm) 验证成功的克隆. 质粒 pFE70 中, panB 基因, panD 基因和 panC 基因的编码区处于由质粒 pKK223-3 编码的 tac 启动子的控制下并且形成操纵子.

借助于 HindIII-SphI (Pharmacia Biotech (Freiburg, 德国), 产品描述 SphI, 密码号 27-0951-01) 裂解从质粒 pFE65 分离 panE 基因, 将该批裂解产物在 0.8% 琼脂糖凝胶上 (30 分钟, 10V/cm) 分离和借助于 GLASSMAX™ 试剂盒分离 panE 片段. 借助于 T4 DNA 连接酶, 将也用 HindIII 和部分用 SphI 裂解的质粒 pFE70 与分离的 panE 片段连接, 用该分批连接产物电穿孔菌株 FE5. 通过将电穿孔分批产物涂抹到培养基 E 琼脂 + 0.4% 葡萄糖 + 50 微克/毫升异亮氨酸 + 50 微克/毫升酮异戊酸上平板培养进行对携带质粒的细胞的选择, 所述培养基中加入了 100 微克/毫升氯霉素, 随后在 37°C 培养 48 小时. 在 DNA 分离和在一个克隆中检测用酶 EcoRI, EcoRV 和 SphI, HindIII 和 HincII 裂解之后, 随后在 0.8% 琼脂糖凝胶上进行凝胶电泳 (30 分钟, 10V/cm) 可鉴定需要的质粒, 并且称之为 pFE80. 在质粒 pFE80 中, panB 基因, panD 基因, panC 基因和 panE 基因的编码区处于由质粒 pKK223-3 编码的 tac 启动子的控制下并且形成操纵子.

将 pFE80 电穿孔到大肠杆菌 K12 MG1655, 在 LB 琼脂上进行转化体的选择, 向所述培养基中已经加入 100 微克/毫升氨苄青霉素, 随后在 37℃ 培养 24 小时。获得的菌株称之为 MG1655/pFE80。

#### 实施例 6

在大肠杆菌 K12 菌株 MG1655 的缬氨酸抗性突变体中将大肠杆菌的 panE 基因与大肠杆菌的 panB, panC 和 panD 一起过量表达

将大肠杆菌 K12 菌株 MG1655 涂抹到加入了 0.4% 葡萄糖和 100 微克/毫升缬氨酸(Sigma(Diesenhofen, 德国), V0258)的培养基 E 琼脂。在 37℃ 培养 48 小时之后, 分离菌落。该菌株称之为 FE6。将 pFE80 电穿孔到菌株 FE6 中, 在 LB 琼脂上进行转化体的选择, 向所述培养基中已经加入 100 微克/毫升氨苄青霉素, 随后在 37℃ 培养 24 小时。获得的菌株称之为 FE6/pFE80。

#### 实施例 7

在大肠杆菌 K12 菌株 MG1655 的 avtA::aadB 突变体中将大肠杆菌的 panE 基因与大肠杆菌的 panB, panC 和 panD 一起过量表达

从大肠杆菌 K12 菌株 MG1655 的 avtA 基因的核苷酸序列(EMBL - 基因文库:入藏号 Y00490)开始, 合成 PCR 引物(MWG Biotech(Ebersberg, 德国))。采用标准的 PCR 方法用这些引物可以从大肠杆菌 K12 菌株 MG1655 的染色体 DNA 扩增大小约 1.6 千碱基对的 DNA 片段。通过在 0.8% 琼脂糖凝胶上进行凝胶电泳(30 分钟, 10V/cm)分离测定大小。

来自于大肠杆菌的 avtA 基因的 PCR 引物:

avtA1 5' - TGCTCTCTCTCAACGCCGAA - 3'

avtA2 5' - GAAGCCGCCAACCAGGATAA - 3'

将 avtA 基因的 PCR 产物转化到质粒 pCR®2.1 和转化到大肠杆菌菌株 TOP10F'(Invitrogen(Leek, 荷兰))中。通过用限制性酶 EcoRI 和 SmaI 裂解质粒 pCR®2.1 avtA 的 DNA 证实成功地进行克隆。对此, 借助于 QIAprep Spin 质粒试剂盒和在裂解之后, 在 0.8% 琼脂糖凝胶上(30 分钟, 10V/cm)电泳分离质粒 DNA。将 aadB 基因克隆到质粒 pCR®2.1 avtA 的 SmaI 裂解位点, 获得的质粒称之为 pFE23。对此, 从琼脂糖凝胶(30 分钟, 10V/cm)分离 aadB 基因, 其中分离了质粒 pHP45Ω(EMBL - 基因:文库入藏号 K02163)的 SmaI 限制性分批产物。



用 T4 DNA 连接酶进行连接。将该分批连接产物电穿孔入大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ mc $r$ 。在 PA 琼脂上进行转化体的选择，向所述培养基中已经加入 20 微克/毫升链霉素 (Sigma(Deisenhofen, 德国), Code no. S6501)。借助于 QIAprep Spin 质粒试剂盒分离来自于链霉素抗性的菌落的 DNA 和借助于 EcoRI 和 SphI 酶裂解，随后在 0.8% 琼脂糖凝胶上进行分离 (30 分钟, 10V/cm) 验证成功的克隆。

借助于 EcoRI 限制性裂解，在 0.8% 琼脂糖凝胶上 (30 分钟, 10V/cm) 分离和借助于 GLASSMAX™ 试剂盒分离，从质粒 pFE23 分离 avtA::aadB 基因。借助于 T4 DNA 连接酶，将部分用 EcoRI 裂解的质粒 pMAK705 与该片段连接，用该分批连接产物电穿孔大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ mc $r$ 。通过在 LB 琼脂 + 20 微克/毫升链霉素 + 25 微克/毫升氯霉素上 30℃ 平板培养 24 小时进行转化体的选择。用 QIAprep Spin 质粒试剂盒从氯霉素和链霉素抗性的菌落分离 DNA。用酶 SphI 和 EcoRI 裂解在 0.8% 琼脂糖凝胶上 (30 分钟, 10V/cm) 验证成功的克隆。构建的该质粒称为 pFE24。

借助于 pFE24 将 avtV::aadB 等位基因交换菌株大肠杆菌 K12 MG1655 的染色体 avtA 基因。根据 Hamilton 等人的改进方法用于进行基因交换。将质粒 pFE24 电穿孔到大肠杆菌 K12 MG1655 菌株，在 LB-氯霉素琼脂上将转化体 42℃ 培养 24 小时用于选择共整合子。对于单个化，再次将获得的菌落涂抹在相同的培养基并且在 42℃ 培养 24 小时。为了分解质粒，在 5 毫升 LB 液体培养基上 42℃ 培养单个的菌落 24 小时，然后将连续稀释的液体培养基涂抹在 LB-氯霉素琼脂上平板培养。将连续稀释液在 30℃ 培养 24 小时。对于质粒的消除，以 3 次连续的单个菌落涂抹将从连续稀释液获得的单个菌落在 42℃ 培养在 LB 琼脂上，每次 24 小时。为了检测表型，将获得的单个菌落平行接种到具有下面的培养基的琼脂平板上：LB 培养基 + 20 微克/毫升链霉素和 LB 培养基 + 25 微克/毫升氯霉素。将这些培养基在 37℃ 培养 48 小时。测试 250 个单个菌落，其中之一表型显示以 avtA::aadB 片段交换了染色体的 avtA 基因。该菌株称之为 FE7。

将质粒 pFE80 电穿孔到菌株 FE7，在 LB 琼脂上进行转化体的选择，向所述培养基中已经加入 100 微克/毫升氯苄青霉素，随后在 37℃ 培养 24 小时。获得的菌株称之为 FE7/pFE80。

## 实施例 8

在大肠杆菌 K12 的各个菌株中测定酮泛解酸盐还原酶活性

借助于 Shimizu 等人所述的(生物化学杂志 263: 12077-12084(1988))测定酮泛解酸盐还原酶的比活性。对此, 借助于 Hybaid RiboLyser (Heidelberg, 德国)和 RiboLyser Kit Blue 获得单个菌株的细胞提取物。借助于加入酮泛解酸盐对 NADPH 的消耗测定该提取物的酮泛解酸盐还原酶的活性。对于菌株大肠杆菌 K12MG 1655 测定的酮泛解酸盐还原酶比活性是 6.5mU/毫克, 和对于菌株大肠杆菌 K12 MG1655/pFE65 是 22.0mU/毫克。对于菌株 FE5, 没有检测到活性。

#### 实施例 9

##### 由各个大肠杆菌 K12 菌株形成泛酸盐

在分批培养中调查由菌株 MG1655, MG1655/pFE32, MG1655/pFE65, MG1655/pFE80, FE6/pFE80 和 FE7/pFE80 形成的泛酸盐。所用的培养基是由 Vogel(生物化学杂志 1956, 218: 97-106)描述的加入了葡萄糖(0.4%)作为碳源的培养基 E。所使用的培养基的组成显示于表 2。

表 2

化合物	浓度
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 克/升
一水柠檬酸	2.0 克/升
磷酸氢二钾	10.0 克/升
$\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3.5 克/升

将 25 毫升的所述的营养培养基装填 250 毫升的圆锥瓶和接种该分批原料。在 37℃ 培养 48 小时后, 测定光密度和泛酸盐的浓度。为了测定细胞密度, 使用 Pharmacia 公司(Freiburg, 德国)的 NovaspecII 光密度计在波长 580 纳米处测定光密度。在灭菌过滤的培养物上清液上测定泛酸盐含量。借助于来自于 DIFCO 公司(Michigan, 美国; 第 10 版, 1100-1102(1984))的“DIFCO MANUAL”手册中描述的植物乳杆菌 ATCC®8014 测定泛酸盐(如钙盐)。结果概述于表 3。

表 3

菌株	浓度(微克/毫升)	细胞密度(OD <sub>580</sub> )	生产量(微克/毫升/ OD <sub>580</sub> )
MG1655	0.51	2.8	0.18
MG1655/pFE32	1.7	2.8	0.60
MG1655/pFE65	4.6	2.9	1.6
MG1655/pFE80	14.0	2.9	4.8
FE6/pFE80	35.7	3.2	11.2
FE7/pFE80	41.7	3.0	13.9

## 实施例 10

在酮泛解酸盐存在下由各个大肠杆菌 K12 菌株形成泛酸盐

在分批培养中调查菌株 MG1655, MG1655/pFE32, MG1655/pFE65 菌株利用加入的酮泛解酸盐形成的泛酸盐。对此, 用 50 微克/毫升酮泛解酸盐补充实施例 8 描述的培养基。该试验的其它条件描述于实施例 8。结果显示于表 4。

表 4

菌株	浓度(微克/毫升)	细胞密度(OD <sub>580</sub> )	产生量(微克/毫升/ /OD <sub>580</sub> )
MG1655	6.2	2.9	2.1
MG1655/pFE32	9.0	2.9	3.1
MG1655/pFE65	12.6	2.9	4.3

## 实施例 11

谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 的 ilvC 基因的分离

按照 Tauch 等人(质粒, 33: 168 - 179, 1995)的描述从谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 分离染色体 DNA 并且用限制性酶 Sau3A (Pharmacia Biotech (Freiburg, 德国), 产品描述 Sau3A, 号码 27-0913-02) 部分裂解。借助于“用于核酸的 Nucleotrap 提取试剂盒”(Macherey 和 Nagel, Duren, 德国; Cat. No. 740584) 分离大小范围为 7 - 9 千碱基对的 DNA 片段, 连接到载体 pUC19 (Viera 等人, 1982, 基因, 19: 259 - 268; MBI Fermentas, Lithuania) 的脱磷酸化 BamHI 裂解位点。

采用 Sambrook 等人(1989, 分子克隆: 实验室手册, 冷泉港实验室)描述的方法用 T4 连接酶(Pharmacia Biotech(Freiburg, 德国))保温过夜的 DNA 混合物进行连接。然后将该连接混合物电穿孔大肠杆菌菌株 DH5aMCR(Grant, 1990, 美国国家科学院院报, 87: 4645 - 4649; Tauch, 1994, FEMS 微生物学通讯, 123: 343 - 348)并且涂抹到 LB 琼脂(Lennox, 1955, 病毒学, 1: 190) + 100 毫克/毫升氯霉素平板培养。在 37℃ 培养 24 小时之后, 采用 Birnboim 和 Doly 的“碱性裂解方法”(1977, 核酸研究, 7: 1513 - 1523)再分离质粒 DNA, 可从转化体获得谷氨酸棒状杆菌基因文库。用该基因文库电穿孔在 *panE* 和 *ilvC* 基因中携带突变的大肠杆菌菌株 FE5 的感受态细胞。在再生期之后(Tauch 等人, 1994, FEMS 微生物学通讯, 123: 343 - 347), 用培养基 E 将该分批电穿孔产物洗涤 2 次(Vogel 和 Bonner, 1956, 生物化学杂志 218: 97 - 106)。通过涂抹到培养基 E 琼脂 + 葡萄糖(0.4%) + 100 微克/毫升氯霉素 + 50 微克/毫升异亮氨酸 + 50 微克/毫升酮异戊酸上平板培养选择转化体。借助于 QIAprep Spin 质粒试剂盒从 4 个获得的菌落分离质粒 DNA。通过 *Xba*I 裂解该质粒 DNA 和随后在 0.8% 琼脂糖凝胶上分离(30 分钟, 10V/cm), 证明该质粒是具有约 6.5 千碱基对大小的插入物的 pUC19 载体。将插入物测序, 随后借助于 BLAST 程序(Altschul, 分子生物学杂志 1990, 215: 403 - 410)进行同源性比较, 证明在所有情况下该插入物含有谷氨酸棒状杆菌的整个 *ilvC* 基因(EMBL - 基因文库: 入藏号 L09232)。这些质粒之一称之为 pFE90。

## 实施例 12

### 谷氨酸棒状杆菌的 *ilvC* 基因在

#### 谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 中进行表达

将质粒 pECm3 用于在谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 中表达谷氨酸棒状杆菌的 *ilvC* 基因。质粒 pECm3 是质粒 pECm2(Tauch, 1994, FEMS 微生物学通讯, 123: 343 - 348)的衍生物, 该质粒中的卡那霉素抗性基因已经采用 *Bgl*III(Pharmacia Biotech(Freiburg, 德国), 产品描述 *Bgl*III, 号码 27 - 0946 - 02)和用 *Bam*HI 限制性去除并且随后再连接。质粒 pECm3 和质粒 pECm2 能够在大肠杆菌和谷氨酸棒状杆菌中复制。为了从质粒 pFE90 分离 *ilvC* 基因(实施例 11), 用酶 *Xba*I(Pharmacia Biotech(Freiburg, 德国), 产品描述 *Xba*I, 号码 27 - 0948 - 01)裂解所分离的质粒 DNA, 在 0.8% 琼脂糖凝胶上分离(30 分钟, 10V/cm)裂解批

量物, 和借助于 GLASSMAX™ 试剂盒分离 6.5 千碱基对的 *ilvC* 片段。借助于 T4 DNA 连接酶把也用 *Xba*I 裂解的质粒 pECm3 连接分离的 *ilvC* 片段, 并且将该分批连接产物电穿孔大肠杆菌 FE5 菌株。通过将电穿孔分批产物涂抹到加入了 50 微克/毫升的氯霉素的 LB 琼脂上平板培养进行携带质粒的细胞的选择, 随后在 37℃ 保温 24 小时。在 DNA 分离之后和用 *Xba* 酶裂解一个克隆检测, 随后在 0.8% 琼脂糖凝胶上进行凝胶电泳 (30 分钟, 10V/cm) 之后, 鉴定需要的质粒, 并且称之为 pFE91。

将质粒 pFE91 电穿孔到谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 并且在加入了 75 微克/毫升氯霉素的 LB 琼脂上选择转化体, 随后在 30℃ 保温 48 小时。获得的菌株称之为谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032/pFE91。

### 实施例 13

#### 由谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 形成泛酸盐

在加入了 10 毫克/毫升氯霉素的培养基 CGXII (Keilhauer 等人, 1993, 细菌学杂志, 175: 5595 - 5603) 中调查谷氨酸棒状杆菌菌株 ATCC13032/pFE91 形成的泛酸盐。在下文中将该培养基称之为谷氨酸棒状杆菌测试培养基。该培养基显示于表 5。对于各种情况, 将  $OD_{580}$  为 0.1 的 16 小时大的培养物 (谷氨酸棒状杆菌测试培养基 30℃, 150rpm) 接种到 50 毫升新鲜制备的谷氨酸棒状杆菌测试培养基。在 30℃ 和 150rpm 保温 48 小时之后, 以  $5000 \times g$  离心 10 分钟去除细胞, 将上清液过滤灭菌, 测定泛酸盐的浓度。如实施例 9 所述测定细胞密度。

借助于植物乳杆菌 ATCC®8014 菌株, 如 DIFCO 公司的 “DIFCO MANUAL” (Michigan, 美国, 第 10 版, 1100 - 1102 (1984)) 描述测定泛酸盐 (钙盐)。结果显示于表 6。

表 5

物质	每升的量	评价
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20 克	
脲	5 克	
磷酸二氢钾	1 克	
磷酸氢二钾	1 克	
七水硫酸镁	0.25 克	
MOPS	42 克	
氯化钙	10 毫克	
七水硫酸亚铁	10 毫克	
一水硫酸锰	10 毫克	
七水硫酸锌	1 毫克	
硫酸铜	0.2 毫克	
六水氯化镍	0.02 毫克	
生物素	0.5 毫克	
葡萄糖	40 克	单独高压蒸汽灭菌
原儿茶酸	0.03 毫克	过滤灭菌

表 6

菌株	浓度(微克/毫升)	细胞浓度( $\text{OD}_{580}$ )	生产量(微克/毫升/ $\text{OD}_{580}$ )
ATCC13032	0.2	20	0.010
ATCC13032/pFE91	0.3	20	0.015

## 实施例 14

## 啤酒酵母的 panE 基因的表达

## 1. 阅读框架 YHR063c 的扩增:

从啤酒酵母阅读框架 YHR063c(国家生物技术中心, Bethesda, MD, 美国的入藏号 U00061)的核苷酸序列起始, 合成下面的 PCR 引物(MWG - Biotech, Ebersberg, 德国)。阅读框架的起始和末端由点(·)表示:

●oJD539(5' EcoRI-NotI 起始):

5' - GCG CGA ATT CAG ATC CGC GGC CGC AAA GAG GAG AAA TTA ACT . ATG  
ACT GCA CCA CAC AGA AG - 3'

• oJD540(3' SpeI-PstI 终止):

5' - CGC GAC TAG TCT GCA G. TC AGT CCT TTC TCC AGT CAC - 3'

将通过 C. Guthrie 和 G. R. Fink(酵母遗传和分子生物学导论, 酶学方法, 第 194 期, 学术出版社, San Diego, CA, 1991)的方法分离的啤酒酵母菌株 JD242 的基因组 DNA 用作为模板. 该菌株是二倍体菌株 SC288C(Winston 等人, 酵母 11, 第 53 页(1995))的单倍体分离子代. 其基因组已经被测序(Goffeau 等人, 科学 274, 第 546 页, (1996)). 采用 C. Guthrie 和 G. R. Fink(酵母遗传和分子生物学导论, 酶学方法, 第 194 期, 学术出版社, San Diego, CA, 1991)的方法进行四分子分析. 菌株 JD242 是亮氨酸(*leu2Δ1* 等位基因)和尿嘧啶(*ura3-52* 等位基因)的营养缺陷型. 利用来自于 Roche 公司(Mannheim)的“高准确性扩展聚合酶”试剂盒, 在制造商描述的条件下进行 28 个 PCR 循环扩增大小约 1.2 千碱基对的 DNA 片段. 在 0.8%琼脂糖凝胶上电泳分离来测定大小.

## 2. pJD-YHR063c 的构建:

为了在啤酒酵母中表达 YHR063c 的阅读框架, 把通过 PCR 扩增的产物掺入到大肠杆菌-啤酒酵母穿梭载体 pJDCEX2(附图 8 和 Dohmen 等人, 1995, 生物化学杂志 270, 18099 - 18109).

首先用 EcoRI 和 SpeI(AGS, Heidelberg, 德国)限制 PCR 产物. 然后与已经用 EcoRI 和 XbaI(AGS, Heidelberg, 德国)处理的 pJDCEX2 - DNA 混合, 并且与 T4 DNA 连接酶(Roche, Mannheim, 德国)连接. 将该连接分批产物转化到大肠杆菌菌株 XL1 - Blue(Bullock 等人, 1987, 生物技术 5, 376). 通过在含有 150 微克/毫升的氨苄青霉素(Sigma(Deisenhofen, 德国))的 LB 琼脂上选择获得转化体. 通过碱性裂解(Sambrook 等人, 分子克隆: 实验室手册, 冷泉港实验室, 1989)制备来自于氨苄青霉素-抗性的克隆的质粒 DNA. 通过用 NotI 和 PstI 限制, 随后在 0.8%琼脂糖凝胶上分离, 调查所分离的质粒 DNA. 将具有需要的结构的质粒命名为 pJD-YHR063c(附图 9). 通过用寡聚核苷酸 oJD105 和 oJD106 测序验证克隆到 pJD-YHR063c 中的 PCR 产物的序列.

• oJD105 (T - CYC1):

5' - GAAGTCATCGAAATAG - 3'

●oJD106(P-CUP1):

5' - TCGTTTCTGTCTTTTTC - 3'

### 3. pKK-YHR063c 的构建:

将质粒 pKK223-3(Brosius 和 Holy, 美国国家科学院院报 81, 6929(1984)) 用于在大肠杆菌中表达 YHR063c 阅读框架。对此, 首先用 EcoRI 和 PstI(AGS, Heidelberg, 德国)限制质粒 pJD-YHR063c。在 0.8%琼脂糖凝胶上电泳分离之后, 从中切出约 1.2 千碱基对大小的 YHR063c 片段并且用 QiaexII 凝胶提取试剂盒(Qiagen, Hilden, 德国)分离该 DNA。然后利用 T4 DNA 连接酶(Roche, Mannheim, 德国)将它与已经用 EcoRI 和 PstI 打开的质粒 pKK223-3 连接。将该连接分批产物转化到大肠杆菌菌株 XL1-Blue 中(Stratagene, LaJolla, CA, USA)。通过在含有 150 微克/毫升的氨苄青霉素(Sigma Deisenhofen, 德国)的 LB 琼脂上选择获得转化体。通过碱性裂解(Sambrook 等人, 分子克隆: 实验室手册, 冷泉港实验室, 1989)制备来自于氨苄青霉素-抗性的克隆的质粒 DNA。通过用 EcoRI 和 PstI 限制, 随后在 0.8%琼脂糖凝胶上分离检查成功的克隆。将具有需要的结构的质粒命名为 pKK-YHR063c。

## 实施例 15

### 大肠杆菌突变体 FE5 的补充

为了分析来自于啤酒酵母的 YHR063c 阅读框架的 panE 的功能, 调查该阅读框架的表达是否补充了大肠杆菌菌株 FE5 对泛酸的需求(实施例 1)。该菌株在基因座位 panE 和 ilvC 突变。对此, 首先用质粒 pKK-YHR063c 转化菌株 FE5。

然后调查在已经补充了 50 微克/毫升酮异戊酸(Kiv)和 50 微克/毫升异亮氨酸(Ile)的 M9 基本琼脂(Sambrook 等人, 分子克隆: 实验室手册, 冷泉港实验室出版, 1989)上菌株 FE5/pKK-YHR063c 的生长与加入的泛酸盐(50 微克/毫升)的函数关系。菌株 FE5/pKK223-3 用作为阴性对照, 菌株 FE4/pFE65(实施例 4)用作为阳性对照。表 7 显示试验的结果: 包含于质粒 pKK-YHR063c 中的啤酒酵母阅读框架 YHR063c 补充了大肠杆菌菌株 FE5 的 panE-ilvC 双突变。阅读框架 YHR063c 具有 panE 基因的功能。

表 7

菌株	M9 + Kiv+Ile 含泛酸盐	M9 + Kiv+Ile 不含泛酸盐
FE5/pFE65	生长	生长
FE5/pKK223-3	生长	没有生长
FE5/pKK-YHR063c	生长	生长

## 实施例 16

在各种啤酒酵母菌株中测定酮泛解酸盐还原酶的活性

采用 Dohmen 等人 (Dohmen 等人, 酵母 7, 691 (1991)) 的方法用质粒 pJDCEX2 和 pJD-YHR063c 转化啤酒酵母 JD242 菌株 (参见实施例 14)。在没有亮氨酸但是加入了 1.8% 琼脂的基本培养基上进行转化体的选择 (参见表 8a, b)。

所使用的营养培养基是描述于 Difco 手册的酵母氮源的基本培养基 (YNB) (Michigan, 美国, 第 10 版, 1100 - 1102 (1984)) 的无泛酸变化形式。另外它含有葡萄糖 (2%), 尿嘧啶 (40 微克/毫升), 硫酸铜 (150 微摩尔浓度), 用于诱导 pJDCEX2 和 pJD-YHR063c 的  $P_{cup1}$  启动子, 来自于 CLONTECH 的排出亮氨酸的补充剂 (Heidelberg, 德国, 号码 8605 - 1) (650 微克/毫升) 和补充剂酮泛解酸盐 (100 微克/毫升) 和  $\beta$ -丙氨酸 (100 微克/毫升)。所使用的培养基的组成显示于表 8a 和 b。

表 8a:

化合物	每升的量
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 克
磷酸二氢钾	1 克
七水硫酸镁	0.5 克
氯化钠	0.1 克
氯化钙	0.1 克
$\text{H}_3\text{BO}_3$	500 微克
硫酸铜	40 微克
碘化钾	100 微克
六水氯化铁	200 微克
一水硫酸锰	400 微克
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	400 微克
七水硫酸锌	200 微克
生物素	2 微克
叶酸	2 微克
肌醇	2 毫克
烟酸	400 微克
p-氨基苯甲酸	200 微克
盐酸吡哆醇	400 微克
核黄素	200 微克
盐酸硫胺素	400 微克

表 8b:

添加剂	每升的量
葡萄糖	20 克
尿嘧啶	40 毫克
硫酸铜	24 毫克
排出亮氨酸补充剂	650 毫克
酮泛解酸盐	100 毫克
$\beta$ -丙氨酸	100 毫克

将 50 毫升的所述的营养培养基填充到 250 毫升的圆锥瓶。借助于接种环将琼脂平板上的单个菌落接种到该分批原料中(参见表 8a, b)和在 30℃ 和 175rpm 保温 72 小时。对于该预培养物, 将该预培养物接种到 250 毫升的圆锥瓶的 50 毫升的相同的营养培养基上使得光密度(580 纳米)达到 0.5。在 30℃ 和 175rpm 培养 24 小时之后, 用来自于 Pharmacia 公司(Freiburg, 德国)的 Novaspec II 光度计在 580 纳米的波长处测量光密度值。对于两种培养物都是 4.0。啤酒酵母 JD242/pJDCEX2 和 JD242/pJD-YHR063c 菌株的酮泛解酸盐还原酶比活性按照 Shimizu 等人描述的方法测定(生物化学杂志 263: 12077 - 12084(1988))。

对此, 借助于 Hybaid RiboLyser(Heidelberg, 德国)和 RiboLyser Kit Red 获得单个菌株的细胞提取物。借助于加入酮泛解酸盐时 NADPH 消耗测定提取物的酮泛解酸盐还原酶活性。采用 Bradford 的方法(Bradford, 分析生物化学 72, 第 248 页(1976))测定蛋白质的含量。对于对照菌株 JD242/pJDCEX2 测定酮泛解酸盐还原酶比活性为 3mU/毫克蛋白质和对于 JD242/pJD-YHR063c 菌株测定酮泛解酸盐还原酶比活性为 386mU/毫克蛋白质。

### 实施例 17

#### 由各种啤酒酵母菌株形成泛酸盐

在分批培养中调查啤酒酵母菌株 JD242/pJDCEX2 和 JD242/pJD-YHR063c 形成的泛酸盐。

将表 8a, b 中所述的 50 毫升营养培养基填充到 250 毫升的圆锥瓶。借助于接种环将来自于琼脂平板的单个菌落接种到该分批原料中(参见表 8a, b)和在 30℃ 和 175rpm 保温 72 小时。对于该预培养物, 将该预培养物接种到 250 毫升的圆

锥瓶的 50 毫升的相同的营养培养基使得光密度(580 纳米)达到 0.5。在 30℃ 和 175rpm 培养 24 小时之后, 测量光密度值(580nm)和泛酸盐的浓度。对于细胞密度的测定, 用来自于 Pharmacia 公司(Freiburg, 德国)的 NovaspecII 光度计在 580 纳米的波长处测量光密度值。在过滤灭菌的培养物上清液中测定泛酸盐的含量。

借助于植物乳杆菌 ATCC®8014 菌株, 如 DIFCO 公司的“DIFCO MANUAL”(Michigan, 美国, 第 10 版, 1100-1102(1984))描述测定泛酸盐(钙盐)。结果显示于表 9。

表 9

啤酒酵母菌株	浓度(微克/毫升)	细胞密度( $OD_{580}$ )	生产量(微克/毫升/ $OD_{580}$ )
JD242/pJDCEX2	0.93	4.0	0.023
JD242/pJD-YHR063c	1.12	4.1	0.027

99.10.21

说明书附图

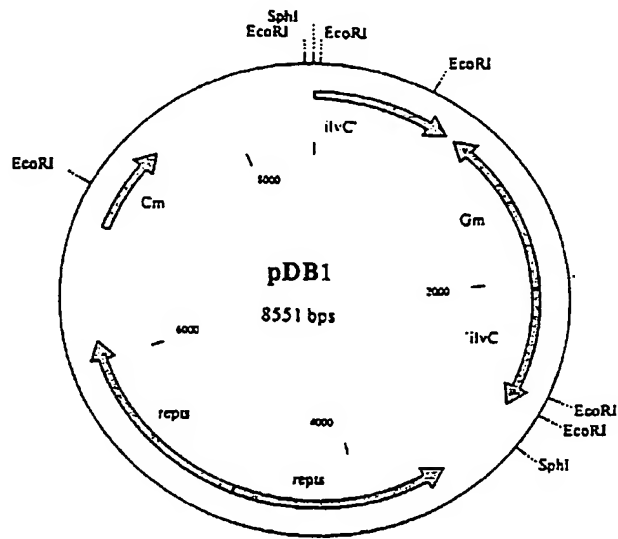


图 1

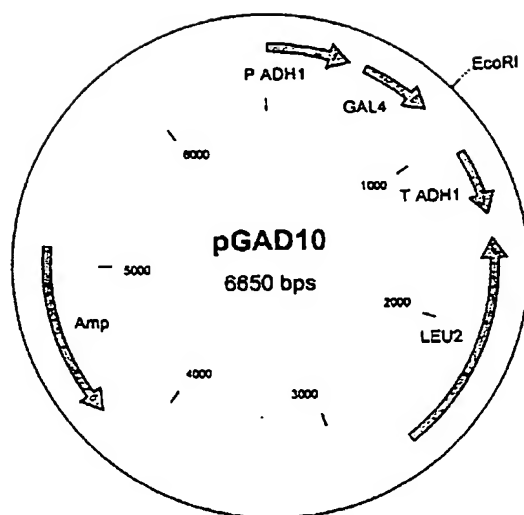


图 2

99.10.21

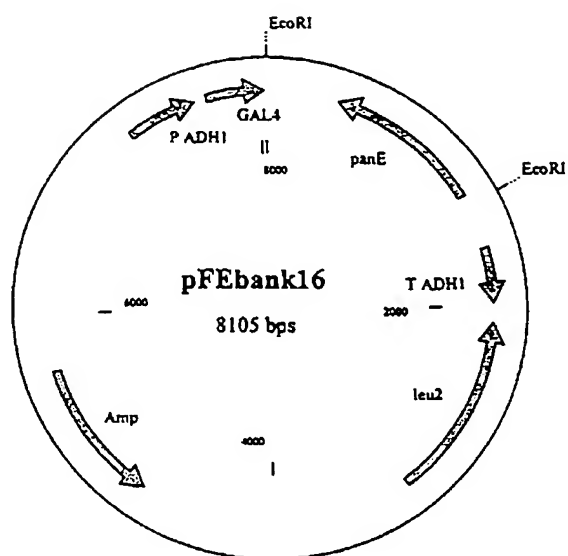


图 3

99.10.21

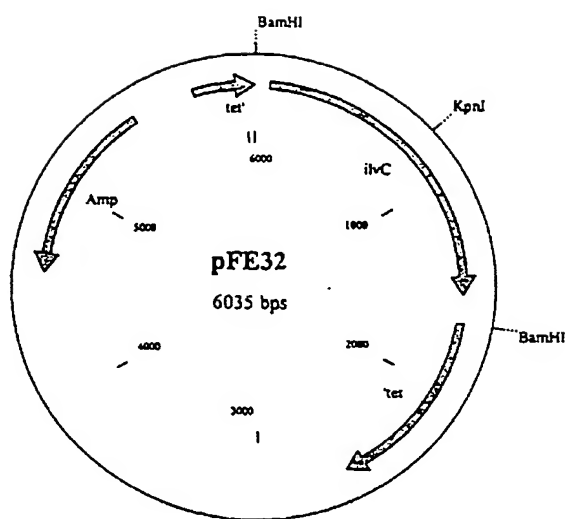


图 4

99.10.21

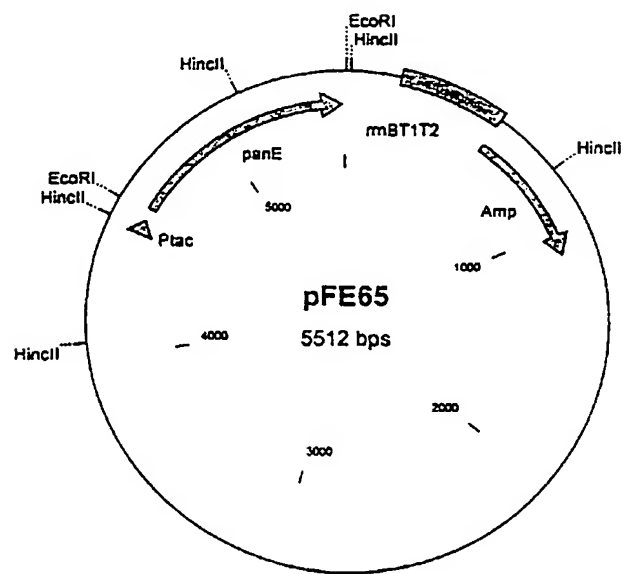


图 5

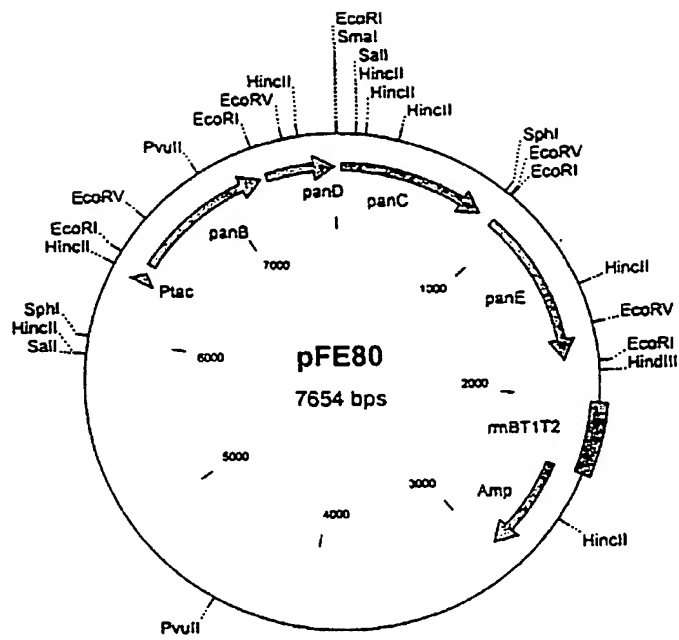


图 6

99.10.21

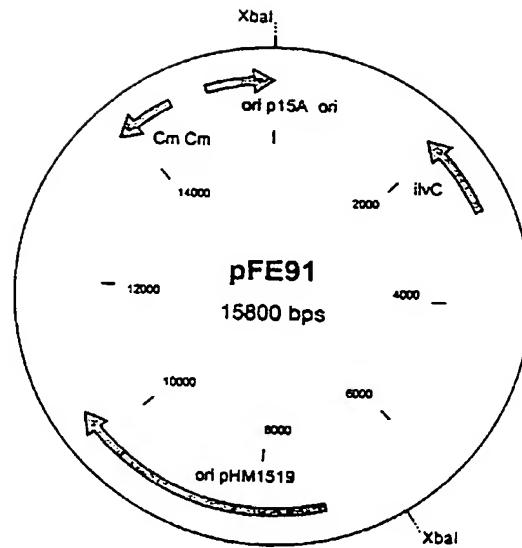


图 7

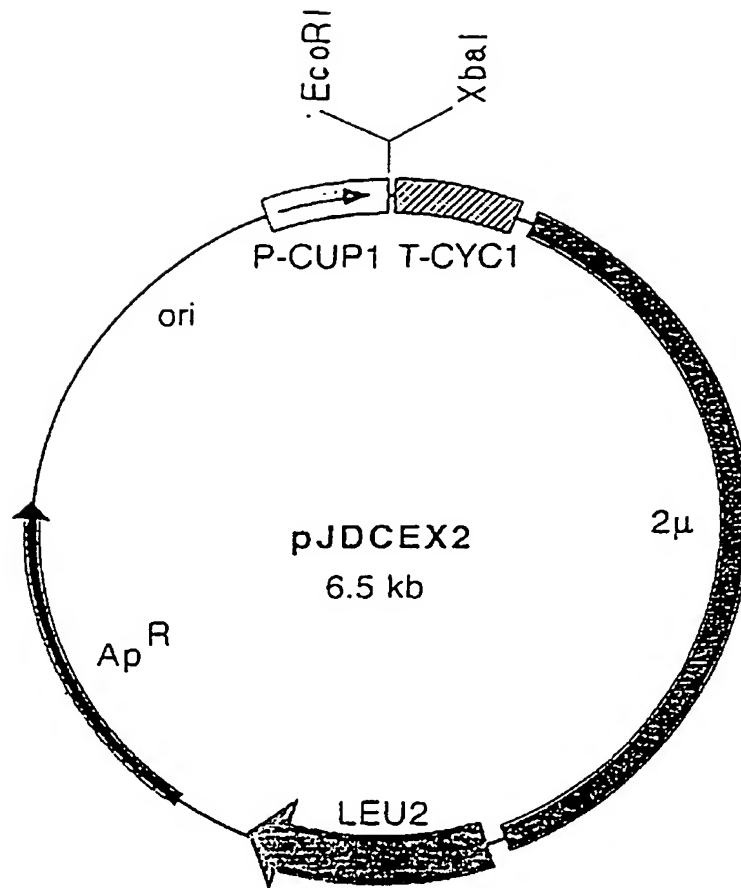


图 8

99.10.21

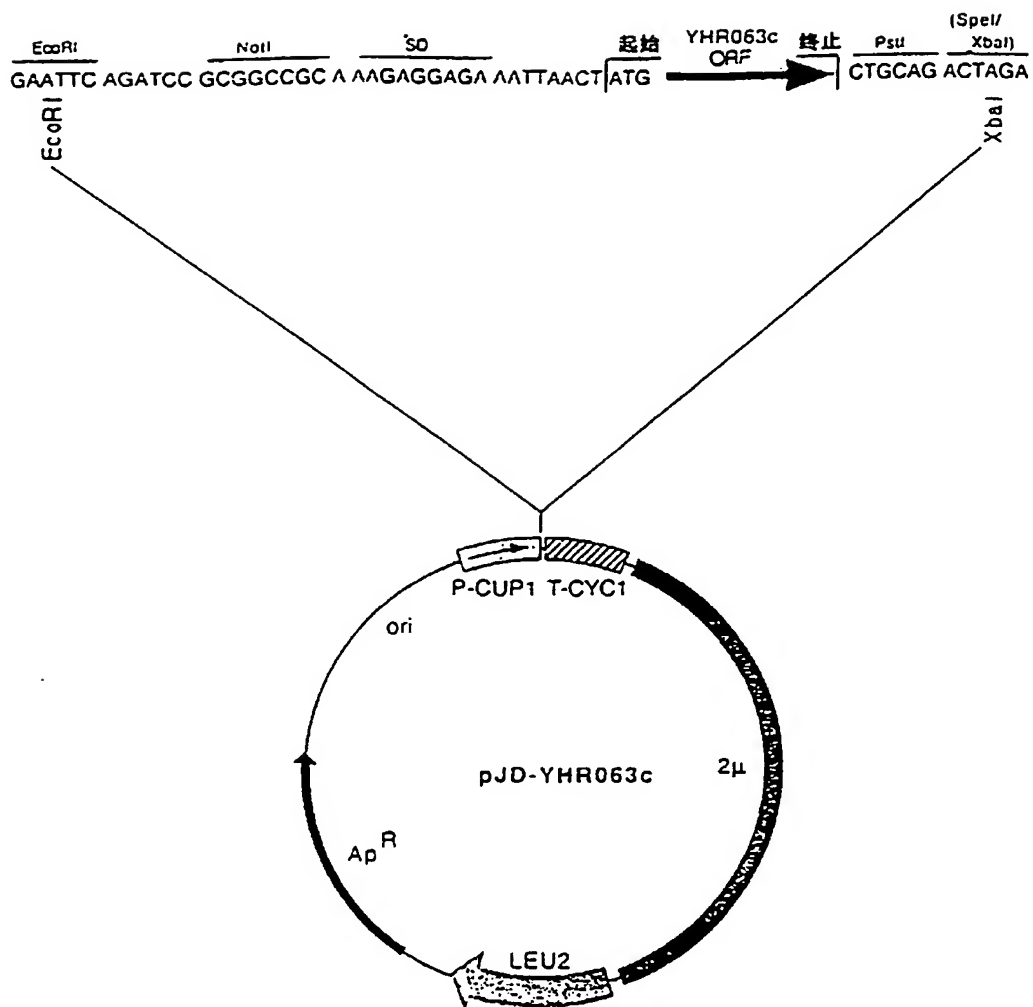


图 9